

การประยุกต์ใช้สารดูดซับคลอโรฟิลล์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีตรวจสอบไวรัสใบหงิก ข้าวในน้ำคั้นพืช ด้วยเทคนิค Dot-Immunobinding Assay

The Application of Chlorophyll Absorbents to Enhance Efficiency of Rice ragged stunt virus Detection in Plant Sap by Dot-Immunobinding Assay

ฐานันท์ พัทลุง¹ วิชชุดา รัตนากาญจน์² และวิภา ตังคนานนท์^{1*}
Thanat Na-Phatthalung¹, Witchuda Rattanakarn² and Wipa Tangkananond^{1*}

บทคัดย่อ

ตรวจสอบระยะเวลาที่น้อยที่สุดและส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าวพันธุ์ไทชุงเนทีฟ 1 ซึ่งได้รับการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกข้าว (*Rice ragged stunt virus*, RRSV) โดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*) ด้วยเทคนิค dot-immunobinding assay (DIBA) สามารถตรวจสอบไวรัสในต้นข้าวได้ ขณะที่ต้นข้าวยังไม่ปรากฏลักษณะอาการของโรคให้เห็น ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นระยะเวลา 15 วัน และสามารถตรวจพบไวรัสได้ในใบและลำต้น ด้วยอัตราเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นพืช 1:5 เท่า ขณะที่ระยะเวลา 60 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่มีการแสดงอาการของโรคปรากฏอย่างเด่นชัด สามารถตรวจพบไวรัสได้ในใบและลำต้น และบริเวณราก ด้วยอัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นพืช 1:500 และ 1:10 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ได้เตรียมน้ำคั้นพืชเพื่อตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค DIBA โดยการใส่สารดูดซับคลอโรฟิลล์ทั้ง 4 ชนิด พบว่า แมกนีเซียมออกไซด์และอะลูมิเนียมออกไซด์เปรียบเทียบกับเบนโทไนท์และผงถ่านกัมมันต์ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจสอบไวรัสในน้ำคั้นพืชบริเวณใบและลำต้น ได้ที่อัตราการเจือจางสูงสุด 1:1,500 และ 1:1,000 เท่า ตามลำดับ และเมื่อใช้แมกนีเซียมออกไซด์และเบนโทไนท์ กับอะลูมิเนียมออกไซด์และผงถ่านกัมมันต์ สามารถตรวจสอบไวรัสในน้ำคั้นพืชบริเวณรากของต้นข้าวได้ที่อัตราการเจือจางสูงสุด 1:50 และ 1:100 เท่า ตามลำดับ การประยุกต์ใช้สารดูดซับคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืชเพื่อตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค DIBA นี้ สามารถตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของไวรัสใบหงิกข้าวน้อยกว่าเดิมถึง 3 เท่า ที่บริเวณใบและลำต้น และน้อยกว่าเดิมถึง 10 เท่า ที่บริเวณราก ดังนั้นการใช้สารดูดซับคลอโรฟิลล์จึงสามารถช่วยเพิ่มความไวของเทคนิค DIBA ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ : ไวรัสใบหงิกข้าว ซีรัมวิทยา สารดูดซับคลอโรฟิลล์

Abstract

The detection of the minimum time and some parts of rice cultivar Taichung Native 1 (TN1) which were transmitted *Rice ragged stunt virus* (RRSV) by brown planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens*). Dot-immunobinding assay (DIBA) technique could use to detect RRSV in asymptomatic TN1 rice. After rice plants were infested within 15 days and could be detected in the sap of both leaves and stems at 1:5 dilution. The RRSV could be detected in the sap of both leaves and stems at 1:500 dilution and root at 1:10 dilution after the plant was infested with the vector for 60 days. In addition, the DIBA technique was prepared the plant sap by using chlorophyll absorbents. Magnesium oxide and aluminium oxide were used to detect RRSV in TN1 rice sap with the highest dilutions of infected rice sap at 1:1,500 in both leaves and stems, whereas the bentonite and activated carbon were detected RRSV with the highest dilutions of

¹ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จ.ปทุมธานี 12120

²สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว เลขที่ 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

infected rice sap at 1:1,000. For the rice sap from the root, the comparison between the magnesium oxide and bentonite and the aluminium oxide and activated carbon can be detected RRSV with the highest dilutions of infected rice sap at 1:50 and 1:100 respectively. The application of chlorophyll absorbents for detection RRSV in infected plant sap by DIBA can be detected RRSV concentration which were three-fold increase from the original plant sap of both leaves and stems and ten-fold increase from the original plant sap of the root. Therefore, the use of chlorophyll absorbents can enhance the sensitivity of the DIBA technique to be more effective.

Keywords: *Rice ragged stunt virus* (RRSV), serology, chlorophyll absorbents

คำนำ

โรคใบหงิกข้าว หรือโรคจู่ข้าว (Rice ragged stunt disease, RRSD) มีสาเหตุจากไวรัสใบหงิกข้าว (*Rice ragged stunt virus*, RRSV) ถ่ายทอดได้โดยมีเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*) เป็นแมลงพาหะ พบการระบาดครั้งแรกที่ประเทศอินโดนีเซียในปี พ.ศ. 2519 (Hibino *et al.*, 1977) นอกจากนั้นก็มีรายงานการระบาดในพื้นที่ปลูกข้าวแถบเอเชียอื่น ๆ ได้แก่ ประเทศฟิลิปปินส์ มาเลเซีย อินเดีย ศรีลังกา บังคลาเทศ ไต้หวัน จีน และญี่ปุ่น เป็นต้น (Luisoni *et al.*, 1982; Guoying *et al.*, 1999) โรคใบหงิกข้าวก่อความเสียหายต่อการปลูกข้าวตั้งแต่ระดับ 10-100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการระบาดของโรคใบหงิกข้าวในประเทศไทยพบครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2520 ในบริเวณพื้นที่ปลูกข้าวเจ้าพันธุ์ กข7 (paddy rice variety RD7) อำเภอบางน้ำเปรี้ยว จังหวัดฉะเชิงเทรา (Chetanachit *et al.*, 1978) ไวรัสใบหงิกข้าว จัดอยู่ในสกุล (genus) *Oryzavirus* วงศ์ (family) *Reoviridae* อนุภาคไวรัสเป็นรูปทรงกลมหลายเหลี่ยม (icosahedral particles) ขนาดประมาณ 60-80 นาโนเมตร ไม่มีเยื่อหุ้ม (non-envelope) จีโนม (genome) จะเป็นชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่เส้นตรง (linear double-stranded RNA) จำนวน 10 ชิ้น (segment) (Conti, 1987; Wu *et al.*, 2010) วิธีการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคที่มีสาเหตุจากไวรัสชนิดนี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญไปสู่การควบคุมโรค การใช้วิธีทางซีรัมวิทยาโดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อกันของแอนติเจนและแอนติบอดีซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลค่อนข้างเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำ งานวิจัยนี้ใช้เทคนิค Dot-immunobinding assay (DIA หรือ DIBA) ซึ่งเป็นเทคนิคทางซีรัมวิทยาที่มีหลักการเช่นเดียวกับเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) มาใช้ในการตรวจสอบช่วงเวลาที่สามารถตรวจพบไวรัสใบหงิกข้าวได้ในขณะที่ต้นข้าวยังไม่แสดงอาการของโรคและการตรวจไวรัสในส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าว รวมทั้งการนำสารดูดซับคอลลอยด์มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค DIBA เพิ่มเพื่อประสิทธิภาพในการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าว เนื่องจากคอลลอยด์ในน้ำคั้นพืชจะรบกวน (interference) การทำปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อกันของแอนติเจนและแอนติบอดี รวมถึงขั้นตอนการตรวจสอบปฏิกิริยาบนตัวรองรับปฏิกิริยา ซึ่งหากสามารถที่จะกำจัดคอลลอยด์ในน้ำคั้นพืชออกได้ ก็จะสามารถเพิ่มความจำเพาะของปฏิกิริยาการตรวจสอบได้ ผลจากการวิจัยสามารถที่จะนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในสภาพธรรมชาติสำหรับเพาะปลูก อันจะเป็นการป้องกันความเสียหายจากการระบาดของโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมแมลงพาหะและไวรัสใบหงิกข้าว

1.1 การเตรียมแมลงพาหะเพื่อถ่ายทอดโรค

เลี้ยงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*) ในสภาพโรงเรือน อุณหภูมิ 27 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ (% relative humidity, RH) 70 ± 10 เปอร์เซ็นต์ และช่วงแสง (photoperiod) 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้นข้าวพันธุ์ไทซุงเนทีฟ 1 (Taichung Native 1, TN1) ตกกล้าข้าวในถาดเพาะต้นกล้า ขนาด $6 \times 12 \times 1.5$ นิ้ว เมื่อต้นกล้าข้าวอายุได้ 10 วัน นำไปให้แมลงดูดกินในกรงเลี้ยงแมลงขนาด $16 \times 16 \times 24$ นิ้ว ซึ่งผนังกรงบุด้วยมุ้งลวดทองเหลืองที่มีความถี่ 40 mesh เปลี่ยนข้าวชุดใหม่ให้แมลงดูดกินเมื่อต้นข้าวชุดเก่าเริ่มเหี่ยวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และต้นข้าวที่นำมาใช้เลี้ยงแมลงไม่มีการฉีดพ่นสารเคมี แต่มีการกำจัดศัตรูของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เช่น มด แมงมุม และจิ้งจก โดยวิธีการจับทำลาย และให้แมลงวางไข่บนต้นข้าว โดยใช้แมลงประมาณ 5-10 ตัวต่อต้นต่อครั้ง ครั้งละ 2 วัน

1.2 การเตรียมต้นข้าวสำหรับใช้เป็นแหล่งอาศัยเพิ่มปริมาณไวรัสใบหงิกข้าว

เก็บตัวอย่างต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิกจากแปลงนาและนำมาเพาะปลูกในเรือนทดลอง และใช้ข้าวพันธุ์ไทซุงเนทีฟ 1 (TN1) ในการทดสอบโรค (เมล็ดข้าวพันธุ์ไทซุงเนทีฟ 1 ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิชาการโรคข้าว สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว) โดยนำต้นกล้าอายุ 10 วัน มาปักดำในกระถางรูปทรงกระบอกก้นปิดขนาด $6 \times 6 \times 6$ นิ้ว กระถางละ 3 กอ กอละ 3 ต้น หลังจากปักดำแล้ว จึงถ่ายทอดไวรัสใบหงิกข้าวโดยใช้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

1.3 การถ่ายทอดไวรัสใบหงิกข้าว

นำเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในวัยที่ 2 มาดูดกินต้นข้าวที่แสดงอาการของโรคใบหงิกอย่างชัดเจน ประมาณ 50-100 ตัวต่อต้น ปล่อยให้แมลงดูดกินต้นข้าวที่เป็นโรคจนกระทั่งต้นข้าวที่เป็นโรคเริ่มเหี่ยวใช้เวลา 7 วัน จากนั้นย้ายแมลงไปเลี้ยงบนต้นกล้าข้าวปกติ อายุ 10 วัน โดยให้แมลงดูดกินนาน 7 วัน เพื่อระยะเวลาให้ไวรัสแฝงตัวในแมลง เปลี่ยนต้นข้าวชุดใหม่ให้แมลงดูดกิน เมื่อต้นข้าวชุดเก่าเริ่มเหี่ยวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลานาน 3 วัน ย้ายแมลงไปสู่ต้นข้าวปกติ อายุ 10 วัน ที่ปักดำไว้ โดยปล่อยให้แมลงดูดกินต้นข้าวเป็นระยะเวลา 2 วัน นำต้นกล้าข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกข้าวแล้วมาพ่นสารป้องกันกำจัดแมลง และนำต้นข้าวใส่ในกรงขนาด $20 \times 20 \times 42$ นิ้ว เพื่อสังเกตลักษณะอาการ

2. การตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค DIBA

2.1 การเตรียมน้ำคั้นพืชสำหรับการตรวจสอบ

บดใบ ลำต้น และรากของต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสใบหงิก (RRSV-infected TN1 rice) และส่วนของต้นข้าวปกติ (healthy TN1 rice) จำนวน 1 กรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวในโถงบดสารที่แช่เย็น ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ความเข้มข้น 0.01 โมลต่อลิตร ที่ระดับความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 เป็นบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer) [0.01 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4] จำนวน 2 มิลลิลิตร ที่แช่เย็น ผสมบัฟเฟอร์สกัดและพืชที่บดให้เข้ากัน เจือจางน้ำคั้นพืชด้วยบัฟเฟอร์สกัดในอัตราส่วน 1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 และ 1:1,000 ตามลำดับ โดยพิจารณาอัตราการเจือจางของน้ำคั้นพืชสูงสุดที่ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจน เปรียบเทียบกับน้ำคั้นพืชจากต้นข้าวปกติ (healthy TN1 rice sap) ที่เตรียมด้วยวิธีเดียวกันกับน้ำคั้นพืชจากต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกซึ่งเป็นสิ่งควบคุมเชิงลบ (negative control, NC) ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) (7×8.4 cm., pore size 0.45 μ m, Bio-Rad) ให้มีขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร ต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วตัดที่มุมหนึ่งเพื่อเป็นเครื่องหมาย นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์สกัด นาน 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นาน 15 นาที

2.2 เทคนิค DIBA บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส

ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยดัดแปลงวิธีการตรวจสอบจาก Hibi and Saito (1985) ดังนี้

(1) หยดตัวอย่างทดสอบ ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที

(2) นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลาย PBS-T-SK [0.01 M PBS (pH 7.4), 0.5 % Tween-20, 5 % skimmed milk (SK)] และบ่มปฏิกิริยาบนเครื่องเขย่า (VSR-50 Laboratory Platform Rocker) ด้วยความเร็ว 10 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

(3) ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลาย PBS-T [0.01 M PBS (pH 7.4), 0.5 % Tween-20] บนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 10 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

(4) แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลายแอนติซีรัมของไวรัสโบหิงก้าขาว (anti-RRSV IgG) ที่ทำการเจือจาง 1:1,000 เท่า ด้วยสารละลาย PBS-T-SK บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน (overnight) (แอนติซีรัมของไวรัสโบหิงก้าขาวได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณวิชชุดา รัตนากาญจน์ สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว)

(5) ล้างส่วนเกินของแอนติซีรัมของไวรัสโบหิงก้าขาวในสารละลาย PBS-T-SK บนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 10 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

(6) แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลาย Goat anti-rabbit serum conjugate alkaline phosphatase (GAR-AP) (ZyMax™) ที่ทำการเจือจาง 1:5,000 เท่า ด้วยสารละลาย PBS-T ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

(7) ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยสารละลาย PBS-T บนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 10 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

(8) ตรวจสอบปฏิกิริยาโดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลาย BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium) (SIGMAFAST™) บ่มไว้ในที่มีดจนกระทั่งสีของปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างชัดเจน (3-5 ชั่วโมง) และหยุดปฏิกิริยาโดยการล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสในน้ำกลั่นบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 10 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที และนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสวางบนกระดาษกรอง ชับจนแห้ง จากนั้นตรวจสอบสีของปฏิกิริยา

2.3 การศึกษาระยะเวลาและส่วนของต้นข้าวที่สามารถตรวจพบไวรัสโบหิงก้าด้วยเทคนิค DIBA

หลังจากถ่ายถอดไวรัสไปสู่ต้นข้าวโดยแมลงพาหะแล้ว วางกระถางต้นข้าวไว้ในโรงเรือนเป็นเวลา 1 วัน เพื่อให้ต้นข้าวฟื้นตัว แล้วทำการเก็บตัวอย่างต้นข้าวทุกวัน เพื่อนำมาตรวจสอบระยะเวลาและส่วนของต้นข้าวที่สามารถตรวจพบไวรัสได้ด้วยเทคนิค DIBA ได้แก่ ใบ ลำต้น และรากของต้นข้าว และใช้ต้นข้าวพันธุ์ไทชุงเนทีฟ 1 ที่ไม่ได้รับการถ่ายถอดไวรัสเป็นสิ่งควบคุมเชิงลบ (negative control, NC) และใช้ต้นข้าวพันธุ์ไทชุงเนทีฟ 1 ที่แสดงอาการของโรคโบหิงก้าอย่างชัดเจน ภายหลังจากได้รับการถ่ายถอดไวรัสโบหิงก้าด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เป็นระยะเวลา 60 วัน เป็นสิ่งควบคุมเชิงบวก (positive control, PC)

3. การประยุกต์ใช้สารดูดซับคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืช ในการตรวจตรวจสอบไวรัสโบหิงก้าด้วยเทคนิค DIBA

3.1 การเตรียมสารดูดซับคลอโรฟิลล์และน้ำคั้นพืช

สารดูดซับที่นำมาใช้ในการดูดซับคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืชมี 4 ชนิด คือ แมกนีเซียมออกไซด์ (magnesium oxide, MgO), อะลูมิเนียมออกไซด์ (aluminum oxide, Al₂O₃), เบนโทไนท์ (bentonite) และผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon) และระดับความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดที่นำมาใช้ คือ 50, 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมน้ำคั้นพืชโดยบดใบ ลำต้น และรากของต้นข้าวพันธุ์ไทชุงเนทีฟ 1 ที่ได้รับการถ่ายถอดไวรัสโบหิงก้าด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลแล้ว เป็นระยะเวลา 60 วัน (RRSV-infected TN1 rice) โดยใช้ส่วนของพืช น้ำหนัก 1 กรัม บดในไนโตรเจนเหลวในโถงที่แช่เย็นซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้เป็นผงละเอียด และเติมบัพเฟอริกสีกต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่แช่เย็น ผสมให้เข้ากัน จากนั้นใช้หลอดหยดคูดน้ำคั้นพืช ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยแรง 14,078 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที [Centurion Scientific, Ltd., (Rotor BRK5424, Radius max 8.75 cm.)] เก็บน้ำใสส่วนบน ถ่ายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารดูดซับคลอโรฟิลล์ในแต่ละระดับความเข้มข้น ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer, VM-4, LABSHOPS) บ่มนาน 3 นาที จากนั้นจึงนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรง 14,078 g ที่อุณหภูมิ

4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บน้ำใส่วางบนนำมาใช้ในการทดลอง

3.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสงและการคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของคลอโรฟิลล์

นำน้ำคั้นพืชที่เตรียมได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer Shimadzu UV-6100) ที่ค่าความยาวคลื่นแสง 652 นาโนเมตร (A_{652}) และคำนวณปริมาณของคลอโรฟิลล์ (chlorophyll content, CT) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามสมการ Arnon formula (John and Edwina, 1996; Chen *et al.*, 2012) (สมการที่ 1) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของคลอโรฟิลล์ (reduced percent) (สมการที่ 2) โดยที่กลุ่มควบคุม (control group) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นพืชที่ไม่มีการเติมสารดูดซับคลอโรฟิลล์ และกลุ่มทดลอง (treatment group) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นพืชภายหลังจากการเติมสารดูดซับคลอโรฟิลล์ ดังนี้

$$\text{สมการที่ 1} \quad \text{Chlorophyll content } (C_T) = \left[\frac{A_{652}}{34.5} \right] \times 1000 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$\text{สมการที่ 2} \quad \text{Reduced percent (\%)} = \left[\frac{A_{652}(\text{control group}) - A_{652}(\text{treatment group})}{A_{652}(\text{control group})} \right] \times 100$$

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลของค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นพืชที่ได้ โดยนำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของตุกี (Tukey's test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (IBM SPSS Statistics Version 21)

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารดูดซับคลอโรฟิลล์

นำน้ำคั้นพืชที่เตรียมได้ในข้อ 3.1 เจือจางด้วยบัฟเฟอร์สก็ดในอัตราส่วน 1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1,000, 1:1,500, 1:2,500 และ 1:5,000 ตามลำดับ เพื่อหาว่าการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นพืชที่สามารถให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนขึ้นเปรียบเทียบกับน้ำคั้นพืชที่ไม่เติมสารดูดซับคลอโรฟิลล์เป็นสิ่งแวดล้อมเชิงลบ (negative control, NC) และทำการตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยเทคนิค DIBA

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะอาการของโรคใบหงิกข้าวบนต้นข้าวพันธุ์ทองเนติฟ 1

ลักษณะอาการต่าง ๆ ของต้นข้าวที่เป็นโรคใบหงิกนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ทุกส่วนของต้นข้าว ซึ่งจะสามารถสังเกตอาการได้ง่ายภายหลังจากระยะเวลาของการถ่ายทอดไวรัสด้วยแมลงพาหะผ่านไปประมาณ 30 วัน โดยจะแสดงอาการลำต้นเตี้ย แคระแกร็น ใบมีลักษณะสีเขียวเข้ม บริเวณปลายใบจะบิดเป็นเกลียว ขอบใบขาดแหงงวินและมีสีขาว ใบใหม่จะแตกช้ากว่าปกติ ใบธงสั้น ฉีกขาด และบิดม้วนเป็นเกลียวจนแน่น เป็นสาเหตุให้รวงข้าวไม่สามารถเจริญได้ตามปกติ (Figure 1)

2. การตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค DIBA

2.1 ระยะเวลาที่สามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกในต้นข้าวได้ ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกในต้นข้าว ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลด้วยเทคนิค DIBA คือ 15 วัน ซึ่งต้นข้าวยังไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น โดยปฏิบัติการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในน้ำคั้นพืชจากต้นข้าวปกติ นั้น ให้สีปฏิกิริยาเป็นสีเขียวปกติซึ่งเป็นสีของน้ำคั้นพืช ในขณะที่น้ำคั้นพืชจากต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกจะให้สีของปฏิกิริยาเป็นสีน้ำเงินม่วง นั่นเป็นผลจากปฏิกิริยาที่จำเพาะ

ต่อกันระหว่างเอนไซม์ alkaline phosphatase และสารตั้งต้นคือ BCIP/NBT โดยจะปรากฏบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสอย่างชัดเจน (Figure 2)

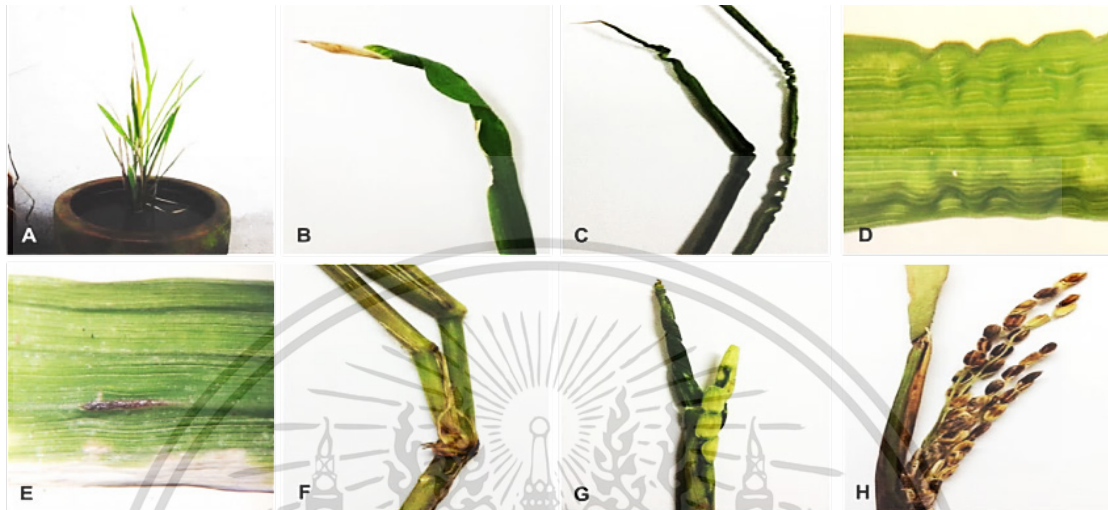


Figure 1 The symptoms of rice ragged stunt disease (A) Stunted (B) Twisted leaf (C) Ragged leaves (D) Galls on the underside of leaf blade and outer surface of leaf sheath (E) Vein-swelling (F) Additional branches (G) Short and Incomplete panicles and (H) Unfilled grains. [The figure D and E were captured by a stereo microscope (Olympus SZ40 stereo microscope 110AL2X WD83, Japan)].

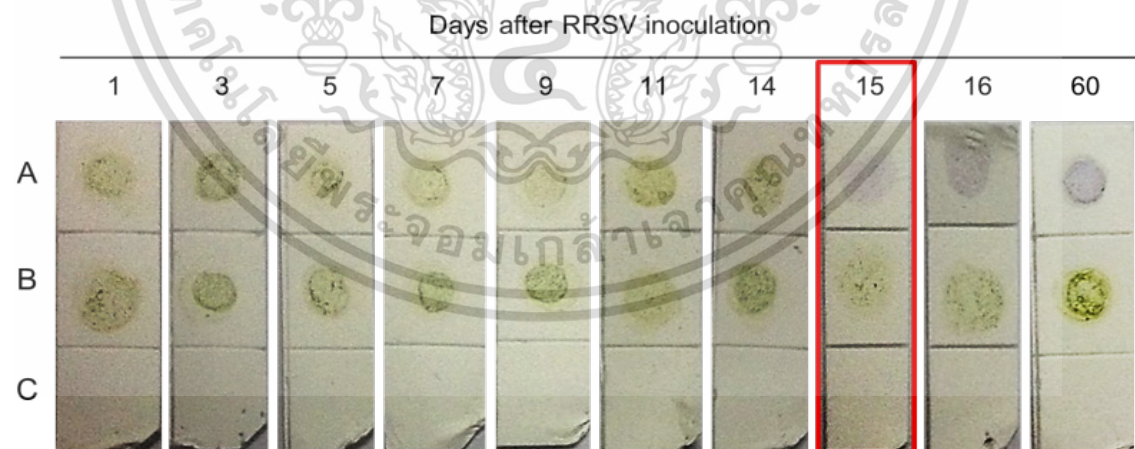


Figure 2 The minimum amount of infected time for detection and diagnosis of RRSV infected rice cultivar Taichung Native 1 (TN1) sap by DIBA (A) RRSV infected rice sap, (B) Healthy rice sap [negative control (NC)] and (C) PBS [negative control (NC)].

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ส่วนของต้นข้าวเป็นโรคที่สามารถตรวจพบไวรัสใบหงิกข้าวได้

หลังจากการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกข้าวเป็นเวลา 15 วัน สามารถตรวจพบไวรัสใบหงิกข้าวได้จากทุกส่วนของต้นข้าว ได้แก่ ใบ และลำต้น ที่อัตราการเจือจางสูงสุด 1:2 และ 1:5 เท่า ตามลำดับ แต่น้ำคั้นพืชจากรากของต้นข้าวไม่เกิดปฏิกิริยาทุกอัตราการเจือจาง ในขณะที่ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสใบหงิกเป็นเวลา 60 วัน สามารถตรวจสอบพบไวรัสได้ในน้ำคั้นพืชทุกส่วนของต้นข้าว ได้แก่ ใบ และลำต้น ที่อัตราการเจือจาง 1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 และ 1:500 เท่า ตามลำดับ และน้ำคั้นพืชจากรากข้าว ตรวจพบปฏิกิริยาที่อัตราการเจือจาง 1:2, 1:5 และ 1:10 เท่า ตามลำดับ (Figure 3)

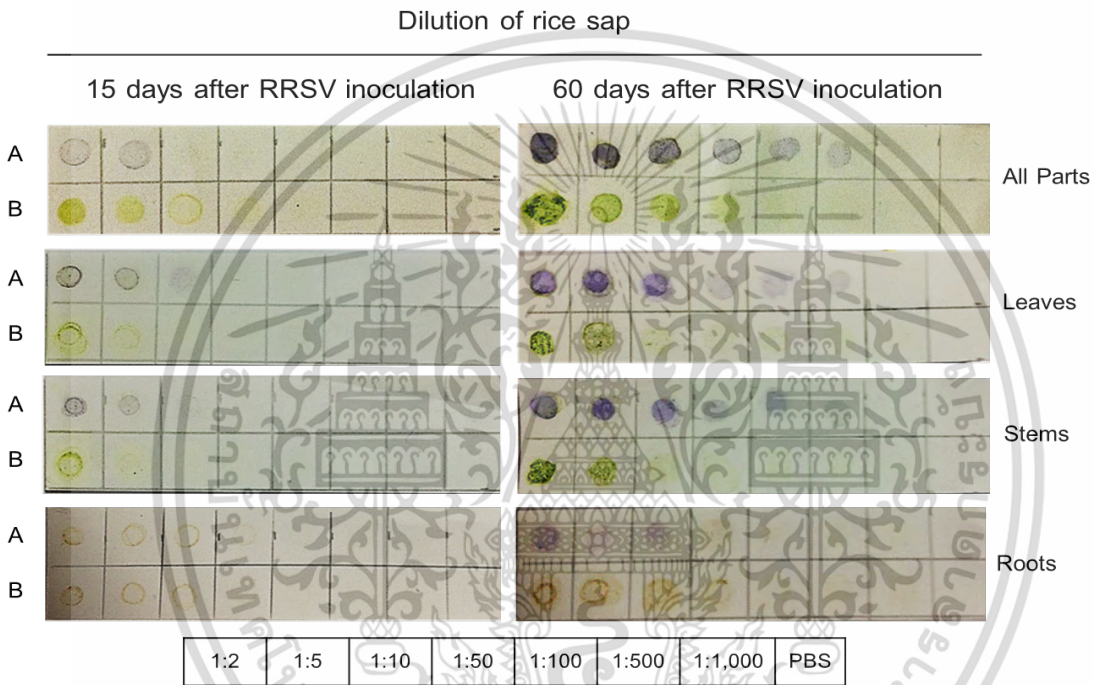


Figure 3 The parts of rice for detection and diagnosis of RRSV infected rice cultivar Taichung Native 1 (TN1) sap by DIBA at 15 days and 60 days after inoculation. (A) RRSV infected rice sap, (B) Healthy rice sap [negative control (NC)].

3. การประยุกต์ใช้สารดูดซับคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืช ในการตรวจตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค DIBA

3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นพืชด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นพืชจากส่วนของใบ ลำต้น และราก มีค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารดูดซับคลอโรฟิลล์ทุกชนิดที่เพิ่มมากขึ้น และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p-value ≤ 0.05) และพบว่าระดับความเข้มข้นของสารดูดซับทุกชนิดที่ระดับ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นพืชมีค่าน้อยที่สุด ซึ่งเมกนีเซียมออกไซด์มีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นพืชลดลงมากที่สุด ใบ ลำต้น และราก ตามลำดับ ในขณะที่อะลูมิเนียมออกไซด์และเบนโทโนที่มีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นพืชลดลงมากที่สุด ใบ ลำต้น ราก และใบ ตามลำดับ และผงถ่านกัมมันต์มีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นพืชลดลงมากที่สุด ใบ ราก และลำต้น ตามลำดับ (Table 1)

3.2 เปรอร์เซ็นต์การลดลงของคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืช

ปริมาณคลอโรฟิลล์ของน้ำคั้นพืชจากส่วนของใบ ลำต้น และราก มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารดูดซับคลอโรฟิลล์ทุกชนิดที่เพิ่มมากขึ้น และปริมาณของคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืชมีค่าน้อยที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของสารดูดซับ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นพืช (Table 1) กล่าวคือ เมื่อระดับความเข้มข้นของสารดูดซับคลอโรฟิลล์เพิ่มมากขึ้น ทำให้สีของน้ำคั้นพืชจางลง ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นพืชจึงลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืชนั้นลดลง ในขณะที่เมื่อระดับความเข้มข้นของสารดูดซับคลอโรฟิลล์ลดลง ทำให้สีของน้ำคั้นพืชเข้มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำคั้นพืชจึงเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืชนั้นเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นไปตามกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer and Lambert's Law) (Table 2) รัศมีวัดที่ทำให้สีของน้ำคั้นพืชมีสีเขียว คือ คลอโรฟิลล์ ซึ่งเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการตรวจสอบไวรัสในน้ำคั้นพืช จากผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้น พบว่า ความเข้มข้นของสารดูดซับทุกชนิดที่ระดับ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารดูดซับทุกชนิดที่ระดับ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแม้ว่าระดับความเข้มข้นของสารบางชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารดูดซับทุกชนิดที่ระดับ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนี้ในการเจือจางน้ำคั้นพืช เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นไมโครเซลลูโลสด้วยเทคนิค DIBA

Table 1 The absorbance (A_{652}) of rice sap after added the chlorophyll absorbents.

Absorbents	Concentration	Absorbance of rice sap		
		Leaves	Stems	Roots
MgO	50	2.112±0.015 ^b	2.033±0.021 ^b	1.580±0.031 ^b
	100	1.740±0.033 ^c	1.716±0.017 ^c	1.444±0.011 ^c
	150	1.403±0.008 ^d	1.386±0.012 ^d	1.315±0.009 ^d
Al ₂ O ₃	50	2.051±0.039 ^b	2.007±0.017 ^b	1.401±0.016 ^b
	100	1.636±0.012 ^c	1.614±0.007 ^c	1.370±0.005 ^b
	150	1.305±0.010 ^d	1.314±0.018 ^d	1.309±0.007 ^c
Bentonite	50	1.864±0.045 ^b	1.799±0.009 ^b	1.383±0.007 ^b
	100	1.630±0.016 ^c	1.651±0.021 ^c	1.350±0.003 ^{bc}
	150	1.578±0.018 ^c	1.596±0.010 ^c	1.309±0.004 ^c
Activated carbon	50	2.128±0.010 ^b	2.087±0.046 ^b	1.620±0.005 ^b
	100	1.825±0.010 ^c	1.772±0.032 ^c	1.430±0.015 ^c
	150	1.638±0.014 ^d	1.583±0.009 ^d	1.305±0.008 ^d
PBS	-	3.050±0.057 ^a	2.989±0.055 ^a	2.245±0.040 ^a

Values followed by the same alphabet in each column are not significantly different by Tukey's test ($P \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 2 The reduced percent (%) of chlorophyll in rice sap after added the chlorophyll absorbents.

Absorbents	Concentration	Reduced percent (%) of chlorophyll in rice sap		
		Leaves	Stems	Roots
MgO	50	30.754±0.434	31.986±0.609	29.619±0.899
	100	42.951±0.864	42.591±0.494	35.677±0.318
	150	54.000±0.221	53.631±0.354	41.423±0.253
Al ₂ O ₃	50	32.754±1.125	32.856±0.494	37.592±0.471
	100	46.361±0.348	46.003±0.214	38.973±0.137
	150	57.213±0.289	56.039±0.528	41.690±0.193
Bentonite	50	38.885±1.314	39.814±0.269	38.394±0.206
	100	46.556±0.469	44.766±0.611	39.864±0.073
	150	48.263±0.175	46.606±0.294	41.690±0.193
Activated carbon	50	30.229±0.276	30.179±1.323	27.837±0.146
	100	40.164±0.277	40.718±0.922	36.300±0.422
	150	46.295±0.392	47.041±0.247	41.869±0.230
PBS	-	-	-	-

3.3 การตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยเทคนิค DIBA

นำน้ำคั้นพืชที่เตรียมได้จากการใช้นิดของสารดูดซับคลอโรฟิลล์ที่แตกต่างกัน ที่ระดับความเข้มข้นสูงที่สุดคือ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรวจสอบด้วยเทคนิค DIBA ผลการตรวจสอบ (Figure 4) พบว่า อัตราการเจือจางของน้ำคั้นพืชจากใบและลำต้น เมื่อใช้แมกนีเซียมออกไซด์และอะลูมิเนียมออกไซด์เป็นสารดูดซับคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืช สามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวได้ที่อัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นพืชที่ 1:1,500 เท่า และเมื่อใช้เบนโทไนท์และผงถ่านกัมมันต์เป็นสารดูดซับคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืช สามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวได้ที่อัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นพืชที่ 1:1,000 เท่า ในขณะที่อัตราการเจือจางของน้ำคั้นพืชจากรากพบว่า เมื่อใช้แมกนีเซียมออกไซด์และเบนโทไนท์เป็นสารดูดซับคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืช สามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวได้ที่อัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นพืชที่ระดับ 1:50 เท่า และเมื่อใช้อะลูมิเนียมออกไซด์และผงถ่านกัมมันต์เป็นสารดูดซับคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืช สามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวได้ที่อัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นพืชที่ระดับ 1:100 เท่า ผลการวิจัยครั้งนี้สามารถตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของไวรัสใบหงิกข้าวในส่วนของใบและลำต้นน้อยกว่าเดิมถึง 3 เท่า และส่วนของรากต้นข้าวน้อยกว่าเดิมถึง 10 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการนำสารดูดซับคลอโรฟิลล์มาใช้ในการเตรียมน้ำคั้นพืช สำหรับการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค DIBA นี้ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพและความไวของวิธีการตรวจสอบได้

การพัฒนาเทคนิค DIBA ในการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยการใช้สารดูดซับคลอโรฟิลล์ในการเตรียมน้ำคั้นพืช เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบ ซึ่งเป็นการลดการรบกวน (interference) ของคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืชต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี รวมทั้งการตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนตัวรองรับปฏิกิริยา

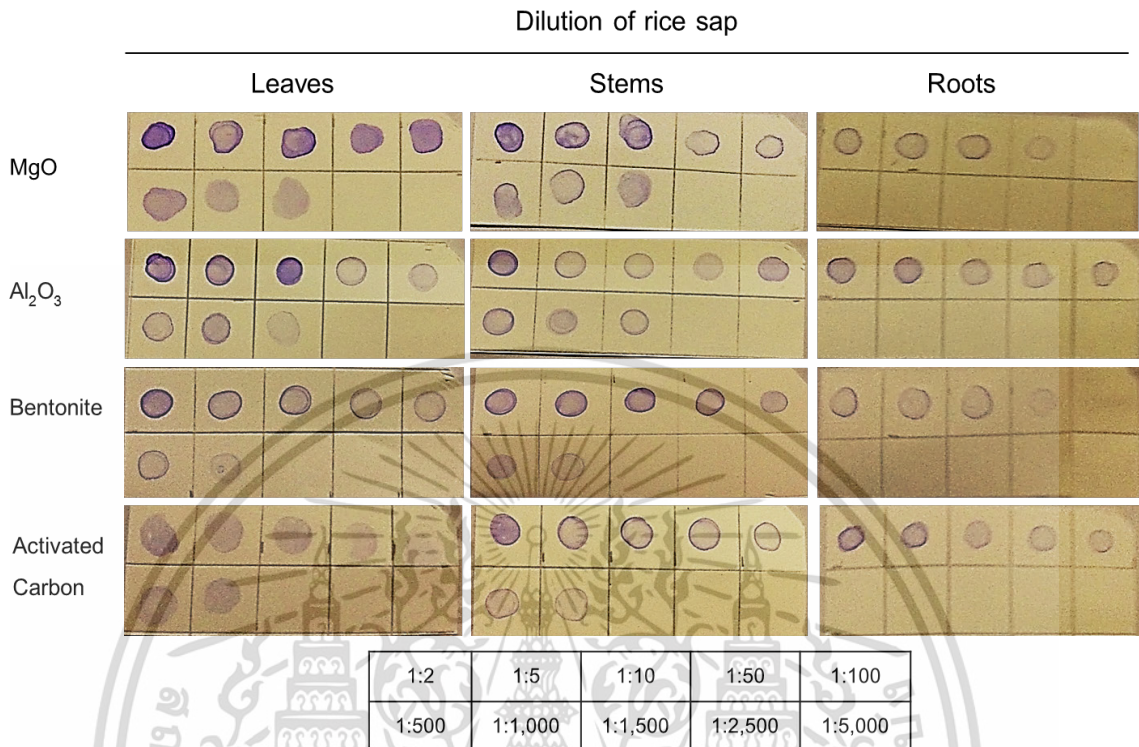


Figure 4 The efficiency of chlorophyll absorbents for parts of rice modified the diagnosis of RRSV infected rice cultivar Taichung Native 1 (TN1) in sap by DIBA.

สารดูดซับคลอโรฟิลล์ที่นำมาใช้ประกอบด้วย แมกนีเซียมออกไซด์ อะลูมิเนียมออกไซด์ เบนโทไนท์ และผงถ่านกัมมันต์ ซึ่งสารดูดซับคลอโรฟิลล์นี้ทำให้น้ำคั้นพืชมีความใส (clarifying agents) และเป็นสารที่ช่วยในการตกตะกอน (fining agent) ไปรตีนและสารรบกวนปฏิกิริยาอื่น ๆ ซึ่งปัจจุบันพื้นผิวของสารดูดซับคลอโรฟิลล์จะมีประจุลบสามารถดึงดูดประจุบวกได้ดี รวมทั้งพื้นที่ผิวและโครงสร้างของสารดูดซับคลอโรฟิลล์ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ทำให้สารรบกวนต่างๆ ที่อยู่ในน้ำคั้นพืชสามารถเข้าไปในรูพรุนและตกตะกอนไปพร้อมกับสารดูดซับเมื่อมีการนำไปหมนเหวี่ยง นอกจากนี้หากหมู่ฟังก์ชัน (functional group) บนผิวของโมเลกุลสารดูดซับเป็นพวกออกไซด์ และมีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นกรด ความสามารถในการดูดซับจะลดลง แต่หากมีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) ความสามารถในการดูดซับจะเพิ่มมากขึ้น (ศหาวุธ, 2544) เมื่อนำสารดูดซับคลอโรฟิลล์มาใช้ในการเตรียมน้ำคั้นพืชเพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค DIBA จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและความไวของการตรวจสอบได้ โดยพิจารณาจากผลการตรวจสอบปฏิกิริยาบนตัวรองรับปฏิกิริยาซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากอัตราการเจือจางน้ำคั้นพืชที่เพิ่มมากขึ้น การตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในส่วนต่างๆ ของต้นข้าวด้วยเทคนิค DIBA สามารถตรวจพบไวรัสใบหงิกข้าวได้จากส่วนของใบ ลำต้น และรากของต้นข้าวตามลำดับ ข้อมูลที่ได้ส่วนนี้จะมีประโยชน์ต่อการศึกษาลักษณะการแพร่กระจายไวรัส ซึ่งสามารถที่จะเลือกเก็บตัวอย่างได้จากส่วนของต้นข้าวที่สามารถตรวจพบไวรัสได้ทั้งที่ยังไม่แสดงอาการของโรค และสามารถใช้ในการพยากรณ์การแผ่ตัวของไวรัสใบหงิกข้าวตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการเจริญเติบโตของต้นข้าว เพื่อเตือนภัยเกษตรกรในพื้นที่ที่มีการตรวจพบหรือพื้นที่ใกล้เคียงให้มีการเฝ้าระวังการระบาดของโรค และการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อไวรัสใบหงิกข้าวและการทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในสภาพธรรมชาติ ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่กรมการข้าวและกรมวิชาการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แนะนำให้เกษตรกรเพาะปลูก เช่น สุพรรณบุรี 1 สุพรรณบุรี 2 สุพรรณบุรี 3 สุพรรณบุรี 90 พิษณุโลก 2 กข 29 กข 31 และ กข 41 ที่ต้านทานต่อโรคใบหงิกข้าวและแมลงพาหะในสภาพธรรมชาติ หรือใช้พันธุ์ข้าวลูกผสมที่ได้จากพ่อแม่พันธุ์ที่มีความต้านทาน และในพื้นที่เดียวกันควรปลูกข้าวหลาย ๆ พันธุ์เพื่อชะลอการปรับตัวของไวรัสและแมลง และควรปลูกสลับระหว่างพันธุ์ต้านทานสูงกับพันธุ์ทนทานหรือพันธุ์อ่อนแอปานกลาง โดยพิจารณาอายุเก็บเกี่ยวให้ใกล้เคียงกันเพื่อลดความเสียหายในกรณีที่เกิดการระบาดของโรคและแมลงพาหะที่รุนแรง (วันทนา และคณะ, 2550; ณัฐพงศ์, 2557)

สรุป

การตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวในน้ำคั้นพืชด้วยเทคนิค DIBA ซึ่งระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบไวรัสใบหงิกในต้นข้าว ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัสด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล คือ 15 วัน โดยอัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นพืชจากใบและลำต้น สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับ 1:5 เท่า ในขณะที่ระยะเวลา 60 วัน ภายหลังจากการถ่ายทอดไวรัส สามารถตรวจพบไวรัสได้จากอัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นพืชจากใบและลำต้น และรากข้าวที่อัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นพืช 1:500 และ 1:10 เท่า ตามลำดับ การเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวด้วยเทคนิค DIBA โดยการนำสารดูดซับคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืชมาใช้ พบว่า เมื่อใช้แมกนีเซียมออกไซด์ และอะลูมิเนียมออกไซด์ เปรียบเทียบกับเบนโทไนท์และผงถ่านกัมมันต์เป็นสารดูดซับคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืช สามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวได้ที่อัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นพืชในใบและลำต้นที่ระดับ 1:1,500 และ 1:1,000 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ค่าการเจือจางของน้ำคั้นพืชจากราก เมื่อใช้แมกนีเซียมออกไซด์และเบนโทไนท์ และอะลูมิเนียมออกไซด์และผงถ่านกัมมันต์ เป็นสารดูดซับคลอโรฟิลล์ในน้ำคั้นพืช พบว่า สามารถตรวจสอบไวรัสใบหงิกข้าวได้ที่อัตราการเจือจางสูงสุดของน้ำคั้นพืชที่ระดับ 1:50 และ 1:100 เท่า

กิตติกรรมประกาศ

บทความวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2558 ภายใต้วินิจฉัยทั่วไป ตามสัญญาเลขที่ ทน 31/2558 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระชัย รัตนานันต์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และ ดร. บุษยา ไทยสมบุญรอด สุขสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ฝ่ายสหรัฐ (Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, AFRIMS) ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางในการดำเนินงานวิจัยและสำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- คชาวุธ ภาชนะ. 2544. เอกสารประกอบการสอน วิชา 303432 เคมีพื้นผิว. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
 ณัฐพงศ์ เมธินธรังสรรค์. 2557. เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ศัตรูตัวฉกาจของชาวนาไทย. วารสารการเวก, 10(1), 10-13.
 วันทนา ศรีรัตนศักดิ์, เรวัต ภัทรสุทธิ, นลินี เจียววรรณะ, เพชรหทัย ปฏิรูปานุสร, ถนอมจิตร์ ฤทธิมนตรี และเพชร ช่างซิ้ม. 2550. แมลง-สัตว์ศัตรูข้าว และการป้องกันกำจัด. กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีการอารักขาด้านแมลงและศัตรูข้าว สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตร. กรุงเทพฯ. 4-7.
 Chetanachit, D., Putta, M., and Disthaporn, S. 1978. Rice ragged stunt in Thailand. International Rice Research Institute (IRRI), 3(4), 14-15.
 Chen, Z., Liu, J., Zeng, M., Wang, Z., Yu, D., Yin, C., Jin, L., Yang, S., and Song, B. 2012. Dot immunobinding assay method with chlorophyll removal for the detection of *Southern rice black-streaked dwarf virus*. Molecules, 17, 886-6900.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Conti, M. 1987. Reovirus of grasses and cereals and their vectors. proc. 2nd Int. workshop on leafhoppers and planthoppers of economic importance, held Provo, Utah USA, 28th July-1st Aug, 1986. Eds. M.R. Wilson & L.R. Nault, CIE, London, 93-100.
- Guoying, Z., Xiongbing, L., Huijuan, L., Juanli, L., Shengxiang, C., and Zuxun, G. 1999. *Rice ragged stunt oryzavirus*: role of the viral spike protein in transmission by the insect vector. Association of Applied Biologists, 135, 573-578.
- Hibi, T., and Saito, Y. 1985. A dot immunobinding assay for the detection of *Tobacco mosaic virus* in infected tissue. Journal of General Virology, 66, 1191-1194.
- Hibino, H., Roechan, M., Sudarisman, S., and Tantera, D. M. 1977. A virus disease of rice (Kerdil hampa) transmitted by brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal, in Indonesia. Contributions Central research institute for agriculture, 35, 1-15.
- John, W., and Edwina, S. M. 1996. Light-induced proton transport through chloroplast membranes. Biochemical Education, 24(3),179-180.
- Luisoni, E., Milne, R., and Roggero, P. 1982. Diagnosis of *Rice ragged stunt virus* by enzyme-linked immunosorbent assay and immunosorbent electron microscopy. Plant Disease, 66, 929-932.
- Wu, J., Du, Z., Wang, C., Cai, L., Hu, M., Lin, Q., Wu., Z, Li, Y, and Xie, L. 2010. Identification of Pns6, a putative movement protein of RRSV, as a silencing suppressor. Virology Journal, 7(335), 1-6.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้